中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 29(2)：157～165 (1980)

葡萄組織培養之研究

環境因子對葡萄癒傷組織生長及分化的影響[1]

賴 本 智[2]　　易 希 道[3]

摘要：巨峰葡萄 (*Vitis viniferal* L. CVS. Sentenial X 石原早生) 植株的莖段，葉片及果肉培養於含 NAA 0.1mg/l、Kinetin 0.2 mg/l 及 15% (w/v)coconut milk. 的 Gamborg 和 Eveleigh 基本培養基中可誘導形成癒傷組織，經上述培養基繼代培養得多量癒傷組織，以進行各種環境因子對其生長及分化影響的測定。經研究顯示，莖段癒傷組織生長最適的 PH 值為 5.6。光線的強弱能影響癒傷組織的生長，果肉癒傷組織適合生長於 750 到 3,000 lux 之間的光強，光強超過 4,500 lux 或在黑暗下培養均不利於癒傷組織的生長。在各種光質中以藍光最適於果肉癒傷組織的生長，黃光、紅光次之，綠光較差，固體培養基培養之葉片與莖段癒傷組織均可形成鳥巢狀的維管束環節 (nest-like Vascular nodule)，其內部具有許多木質化的細胞或管形細胞，外部則具有許多類似形成層細胞 (Cambium-like cells) 的環狀結構，由此類形成層結構，可再進一步分化形成根。而葉片癒傷組織外部的細胞也可分化形成芽原體 (shoot primordia) 之構造。果肉癒傷組織在任何培養情形下，均無分化的細胞。液體震盪培養下的葉片和莖段癒傷組織其細胞僅可分化形成似根之多極性 (poly-arch) 維管組織型 (Vascular pattern)，無再進一步分化的現象。而果肉癒傷組織則均呈游離的細胞或細胞羣，沒有癒傷組織塊的形成，也無分化的現象。液體震盪培養雖能誘發葉片及莖段癒傷組織的特化，唯較固體培養者差。

培養基的物理條件如酸鹼度 (pH)、固態及液態培養基通常為造成癒傷組織生長差異的主要原因[2,10,19]，Hildebrandt 等人報導 pH 5.6 時，最適合菸草莖段癒傷組織的生長，過高或過低均可能產生不利之作用[14]。蔡氏報導甘藷花葯癒傷組織生長最適之 pH 值以 6.5 為最佳[2]。液體震盪培養不僅可增進極易產生褐化物質(如酚酞類或過氧化酵素等)的培養材料生長或增殖，而且更適於單細胞之大量培養[3,19]。環境因子中如光線的質和量亦為左右癒傷組織生長及分化的主要因子[6,10,24]，癒傷組織培養早期，因可利用培養基中的碳源行異營生長，對於光線的需求較不敏感[18,28]；但到培養後期，光線不僅能影響到癒傷組織的生長，也可參與其形態發生，尤其是芽之誘發[24]及根的形成[10]，光照太強或太弱均不利於癒傷組織的生長，Weis 等[24]報導不同的光質如紅、黃、藍、綠光等，對於菸草髓部癒傷組織的生長及分化有很密切的關係存在。故適度的光照及正確的光質常為癒傷組織生長及分化所必需。

上述培養基的物理條件及環境因子對葡萄癒傷組織的影響鮮為人知，本文即針對培養基酸鹼度，固體或液體以及環境因子中之光量與光質等因子對葡萄癒傷組織之作用詳加探討。

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 931 號
2. 本所技佐。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
3. 國立中興大學植物系教授。臺灣省 臺中市。

料料與方法

將巨峰葡萄植株新芽上之莖段、葉片及果肉培養於含 NAA 0.1 mg/l、Kinetin 0.2 mg/l 及 15% (w/v) 椰子胚乳液之 Gamborg 和 Eveleigh (1968) 基本培養基上，於溫度 25±1°C，日光燈源的光度為 750~1,000 lux，光週期 12 小時的培養環境下所誘導的癒傷組織，以上述培養條件繼代培養所得之大量癒傷組織為材料，並以每一處理重覆30次所得之平均值計算，探討下列各種環境因子的影響。

一、酸鹼度對癒傷組織生長的影響

秤取 100 mg 的莖段癒傷組織，移入消毒前酸鹼度分別為 4.4，4.8，5.2，5.6，6.0，6.4 及6.8 的基本培養基中，培養 4 週後測其鮮重及乾重（在 60°C 中烘乾24小時後測得。）

二、光對癒傷組織生長的影響

(一) 光質：秤取 40 mg 的果肉癒傷組織，移入含基本培養基的試管中，置於約 2,500 lux 之白色日光燈下，其燈管外包以一層賽璐玢色紙 (Cellophane paper)，有紅色、綠色、藍色、黃色四種，其中黃色包以二層，另包以黑色厚紙者作為對照處理[1]。經 5 週培養後測定其鮮重及乾重。

(二) 光度：秤取 40 mg 的果肉癒傷組織，移入基本培養基中，培養於光度分別為 4,500，3,000，1,500，750 及 250 lux 的培養架上。另以包黑色厚紙者為對照處理，經培養 5 週後測其鮮重

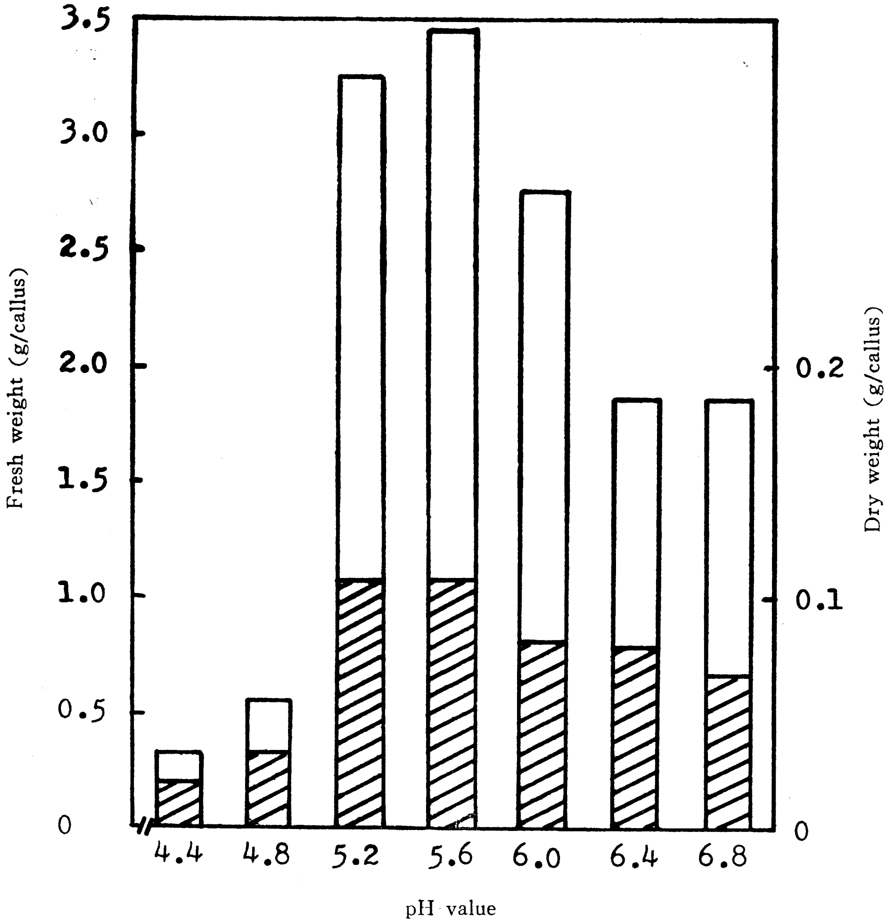


圖 1. 培養基酸鹼度對葡萄莖段癒傷組織生長之影響。

Fig. 1. Effect of pH value on the growth of grape stem callus after 4 weeks in culture.

及乾重。

三、液體震盪培養對癒傷組織生長及分化的影響

將固體培養基培養所得之癒傷組織切取約 2 g 大小，移至僅不含洋菜之固體基本培養基中，於每分鐘震盪 70 次之震盪器上培養，5 週後以 FAA 固定做成石臘切片再和固體培養所得之癒傷組織切片加以比較，以了解各種不同器官來源的癒傷組織生長情形及其分化程度。

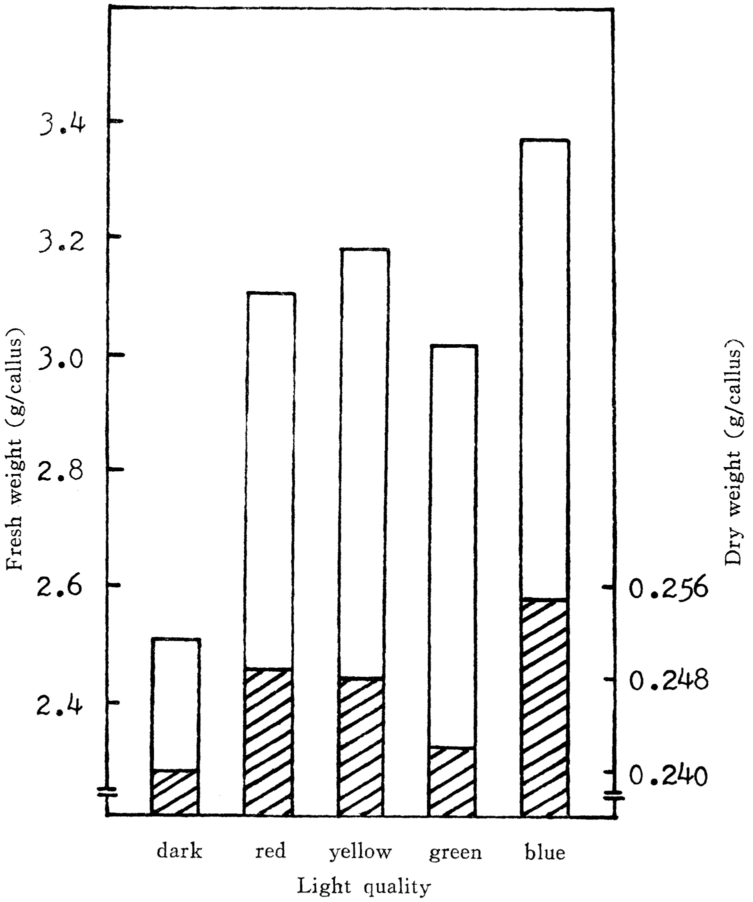


圖 2. 光質對果肉癒傷組織生長的影響。

Fig. 2. Effect of light quality on the growth of grape fruit callus after 5 weeks in culture.

結果與討論

一、癒傷組織生長的最適酸鹼度

在以莖段癒傷組織所做的培養試驗中，發現 pH 5.6 時，鮮重增加最多，5.2次之，但二者乾重差異不顯著；其適應的酸鹼度爲 5.2～6.0 之間（圖 1），此與 Hildebrandt 等氏[13,14] 利用向日葵和菸草的莖段及 Anstis [4] 利用馬鈴薯塊莖等的癒傷組織所做酸鹼度的試驗結果相一致 [4,13,14]，但蔡氏[2] 等報導甘藷花藥癒傷組織生長以 pH 6.5 爲最佳，此等差異可能是所用的材料種類不同之故。一般癒傷組織的生長均較適合於稍酸性培養基。可能的原因是在微酸時，大部鹽類保持在可溶性的有效狀態，以供癒傷組織的吸收與利用[20]。當pH 值低於 5. 0時，癒傷組織的生長顯著減少，可

能係酸性過低促使某些成份如噻胺 (thiamine) 於高溫高壓消毒時，發生分解之故[4]；而 pH 值過高却會影響某些激素的吸收[4]，故過高或過低的 pH 值均不利於癒傷組織的生長。

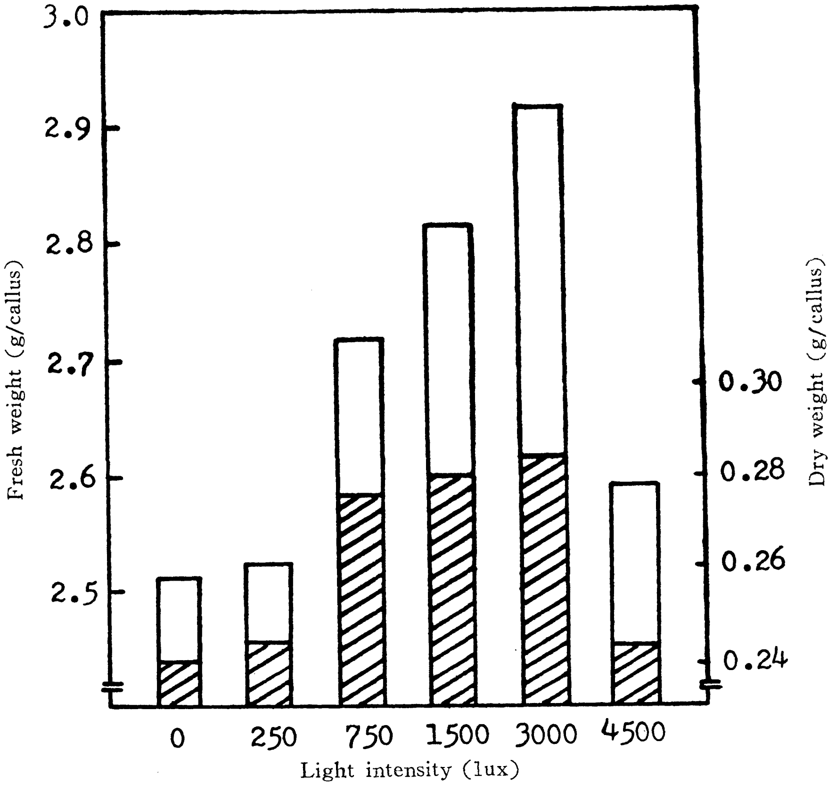


圖 3. 光度對果肉癒傷組織生長的影響。

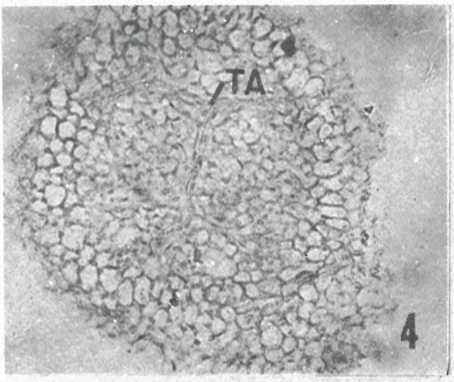
Fig. 3. Effect of light intensity on the growth of grape fruit callus after 5 weeks in culture.

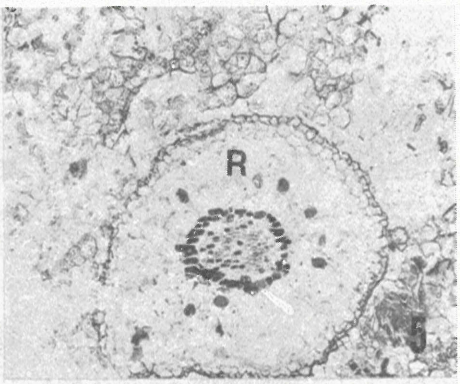
二、光對癒傷組織的影響

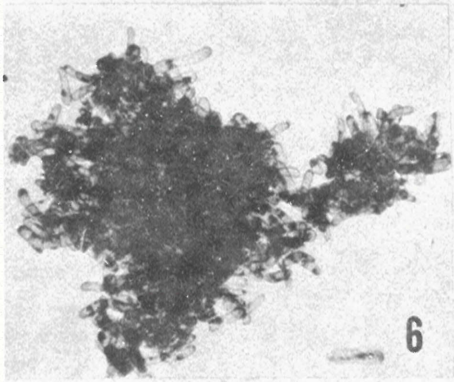
(一) 光質：由圖 2 可知，在各種光質測定中，果肉癒傷組織在藍色光下生長最佳，黃光次之，紅光又次之，綠光效果較差，黑暗下最差，此與 Weis 氏培養於草髓部細胞的結果相似[24]，雖然各種色紙透光率不一，光强或許有些差異，可能會影響部分結果的準確性，唯此項結果仍頗具參考價值。果肉癒傷組織在各種不同光質下也會形成許多葉綠素，其綠色程度亦以藍光、黃光及紅光下較佳，綠光下次之，黑暗下培養的癒傷組織呈現白色，不形成葉綠素，此乃因藍光和紅光為主要的作用光譜，不論在光合作用[15]、葉綠素形成[5,16]、光形態發生[1,24]及光呼吸作用[17]方面均有重要的影響，藍光、紅光不僅可增加光合作用能力，而且有助於葉綠素形成，提高綠色度。綠光常不為葉綠素所吸收，不能加以有效利用[24]，故綠光下癒傷組織的鮮重、乾重及綠色度均較上述者為差。黑暗下培養因無光源可資利用，癒傷組織不含葉綠素，只能行異營生長，後期生長最差。

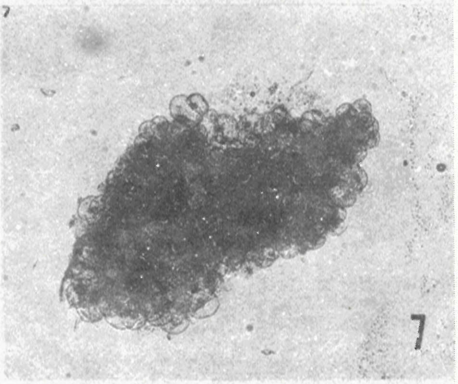
(二) 光度：在不同光度下培養的果肉癒傷組織，由圖 3 可知，以 3,000 lux 的光度下生長最佳，1,500 lux 次之，光度愈弱生長愈差，黑暗時生長最慢。光度過强 (4,500 lux) 也有抑制生長的現象，唯光度愈强其癒傷組織的綠色度愈佳。癒傷組織早期的生長因可利用培養基中的碳源，故對於光線的需求較不敏感[2,8,18]。但到後期光線能影響形態發生，尤其是芽之誘發[24]，故光線對於完整植株的生長是絕對必需的條件； Weis 和 Jaffe[24] 發現於草髓部的癒傷組織在藍光下可促進芽體的形成，一般白光下又比黑暗下更易形成芽體。光線也能影響根的形成，Gautheret 報導

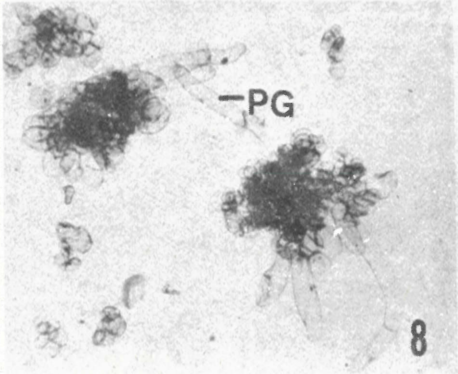
Helianthus tuberosus 塊根癒傷組織，在 Auxin 存在下， 5,000 lux 光强及每日 12 小時之光期時，可促進最多根數的形成， 同時知其作用主要發生在形成層 (Cambium) 區域，而黑暗下雖然 Auxin 也存在時，則會減少根形成的能力 [10] 。Capite [6] 發現胡蘿蔔根部癒傷組織 2,800 lux 的光











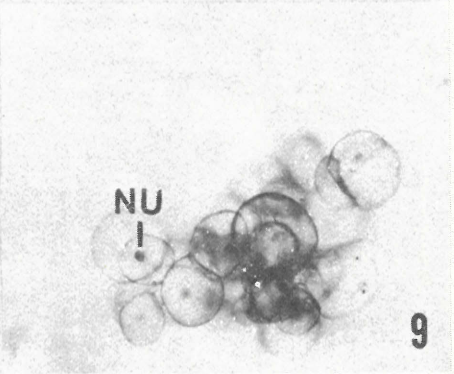


圖 4. 葉片癒傷組織於液體培養時，內部分化為似三極性的根部維管組織。**Fig. 4.** A tri-arch root vascular bundle(TA)initiated from leaf callus cultured in liquid medium.

圖 5. 固體培養時，由葉片癒傷組織內部細胞分化而成根的橫切面。**Fig. 5.** A cross section of root (R) initiated from leaf callus cultured on solid medium.

圖 6. 葉片癒傷組織於液體培養時，顯示分離的細胞羣，細胞為長形。 **Fig. 6.** Leaf callus showing cell colonies which contain long cells in liquid culture.

圖 7. 莖段癒傷組織於液體培養時，顯示分離的細胞羣和圓形細胞。**Fig. 7.** Stem callus showing cell colonies which contain round cells in liquid culture.

圖 8. 果肉癒傷組織於液體培養時，分離出的各種細胞羣，有些細胞呈極性生長。**Fig. 8.** Cell colonies of fruit callus in liquid culture. Some cells showed polar growth (PG).

圖 9. 生長中的果肉細胞羣，具圓形細胞和明顯的細胞核。**Fig. 9.** The fruit cell colonies which contain round cells is showed the nucleus (NU).

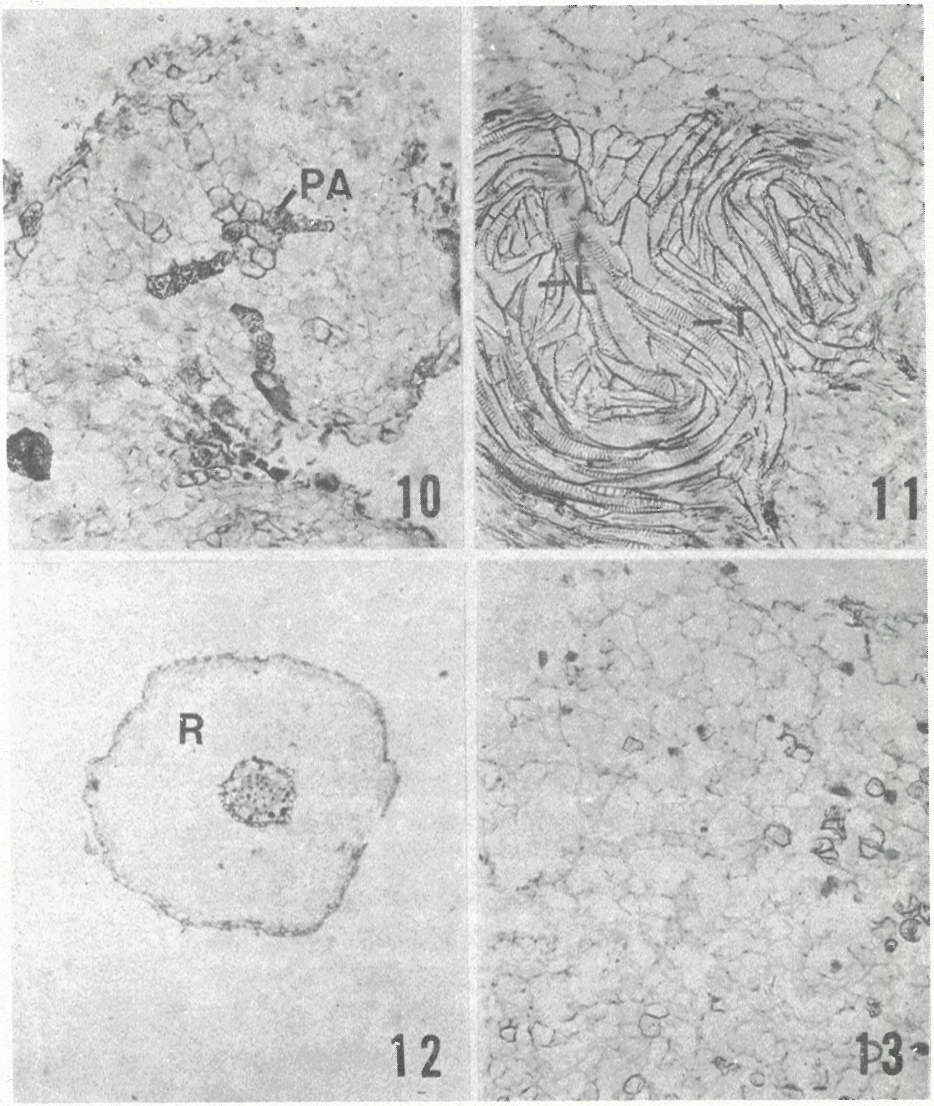


圖 10. 莖段癒傷組織於液體培養時，分化成多極性的根部維管組織。Fig. 10. A poly-arch root vascular bundle (PA) initiated from stem callus cultured in liquid medium.

圖 11. 莖段癒傷組織於液體培養時，內部細胞分化成維管束環節，具有木質化細胞和管形細胞。Fig. 11. The formation of vascular nodule which enclosed lignified cells (L) and tracheid cells (T) initiated from inside of stem callus cultured in liquid medium.

圖 12. 固體培養時，由莖段癒傷組織細胞分裂突出形成根的橫切面。Fig. 12. A cross section of root (R) initiated from stem callus cultured on solid medium.

圖 13. 果肉癒傷組織於固體培養時，細胞無分化現象。Fig. 13. A cross section of fruit callus without any differentiation cultured on solid medium.

強比 1,200 或 6,000 lux 生長爲佳。故光線的強弱會影響到癒傷組織的生長，本試驗所做的葡萄果肉癒傷組織在光線過低 (250 lux) 或黑暗下，癒傷組織呈白色，生長效果較差，與王氏 [1] 在新美娘蘭 (Cymbidium) 癒傷組織培養所得的結果相一致。

三、液體震盪培養對癒傷組織生長及分化的影響

(一) 葉片癒傷組織：葉片癒傷組織經液體震盪培養一個月後，組織增大，內部大多爲薄壁細胞

，有些特化形成維管組織，或分化形成多極性（poly-arch）的根部維管組織型（Vascular Pattern）（圖4），唯其分化程度較固體培養（圖5）者爲差，沒有根及維管束環節（Vascular nodule）的形成，此與廖氏[3] 研究大岩桐葉片癒傷組織在液態震盪培養下仍有胚狀體之形成迥異，可能係因植物特性不一而影響分化能力[23]。又葉片癒傷組織可分離出具有多細胞組成的細胞羣（multi cellular clumps），此等細胞皆由懸浮細胞羣的表面分裂形成，與 Durzan[7] 等氏研究白針樅的雌性配子體癒傷組織在液體培養的結果相似，只有少數細胞呈游離方式存在，而且所有分離的細胞羣或單細胞均呈長形（圖6），異於莖段及果肉癒傷組織於液體培養所得之圓形細胞（圖7、8、9），可能是不同部位的細胞來源所致。

（二）莖段癒傷組織：經液體震盪培養後，質地較爲緻密，部分內部細胞分化形成多極性的根部維管組織型（圖10），或特化形成鳥巢狀的維管組織，其內部具有許多特化的木質化細胞（lignified elements）和管形細胞（tracheid elements）（圖 11），此與 Steward[23] 等氏培養胡蘿蔔根部癒傷組織的細胞結果相同。組織逐漸增大，極少數分離成具有許多圓形細胞的細胞羣（圖7）。液體震盪培養之莖段癒傷組織，較固體培養之分化能力差（圖12），唯仍較果肉癒傷組織在液體培養之分化能力爲佳（圖13）。

（三）果肉癒傷組織：經液體震盪培養後，質地鬆軟極易分散（圖13），分離出許多不等細胞數目的細胞羣（multiple cellular clumps）及少數的單細胞，此等細胞分裂迅速，大部呈圓球形（圖8、9），與 Hawker 等氏[12] 所做的葡萄果肉癒傷組織的液體震盪培養結果相一致。少數細胞可自各種細胞羣表面或自身經過多次分裂，形成許多極性生長的長形細胞羣（圖8），極少數細胞有縱裂的現象，此種分裂方式頗似 Halperin 和 Wetherell 所做的胡蘿蔔根部癒傷組織在液體震盪培養下的細胞分裂情形[11]。唯葡萄果肉癒傷組織不能形成絲狀胚（filamentous embryos），以致未能再進一步分化[11]，在固體培養下之葡萄果肉癒傷組織也無任何分化現象，這種結果與大多數植物的果肉癒傷組織不易分化的結果相同[22]。但極少數種類的果肉細胞仍具有分化的全能性(totipotency)，如酪梨（Avocado）的外果皮（Pericarp）及中果皮（mesocarp） 癒傷組織經培養一年後仍可分化形成根[22]；南瓜（*Zucchini squash*） 的外果皮癒傷組織經培養後可再分化形成小植株[21]。故癒傷組織的分化能力，不僅受到來源、位置和器官的影響，而且也受到植物種類的影響[11,22,23]。

由以上探討得知葡萄癒傷組織最適的生長 pH 值爲 5.6，最適的光質和光度分別爲藍色光及 3,000 lux）固體培養基又比液體震盪培養基適於誘導癒傷組織的分化。

引 用 文 獻

1. 王博仁・1973・高等植物組織的逆分化和再分化現象。生長與分化專題研討會講稿集：87-104。
2. 蔡新聲、林正義・1973・培養基成份、蔗糖濃度、 pH 值、溫度及光線對甘藷花葯 Callus 生長的影響。中華農學會報 新 82：30-41。
3. 廖松淵、易希道・1974・組織培養的條件影響大岩桐癒傷組織形成和器官發育。中興大學植物研究所碩士論文。
4. Anstis, P. J. P. and D. H. Northcote. 1973. The initiation, growth, and characteristics of a tissue culture from potato tubers. J. Exp. Bot. 24(79):425-441.
5. Anstis, P. J. P. and D. H. Northcote. 1974. Chlorophyll accumulation by callus tissue of *Glycine max*. Planta (Berl.) 116 : 105-108.
6. Capite. L. 1975. Action of light and temperature on growth of plant tissue in vitro. Amer. J. Bot. 42 (10):869-873.
7. Durzan, D. J., S. C. Chafe and S. M. Lopushanski. 1973. Effects of environmental change on sugars, tannins, and organized growth in cell suspension cultures of white spruce. Planta (Berl.) 113:241-249.

8. Fraser, R. S. S., U. E. Loening and M. M. Yeomen. 1967. Effect of cell division in plant tissue culture. Nature 215:875.

9. Gamborg, O. L. and D. E. Eveleigh. 1968. Culture methods and detection of glucanases in suspen -sion cultures of wheat and barley. Can . J. Biochem. 46:417-421.

10. Gautheret, R . J. 1969. Inverstigations on the root formation in the tissue of *Helianthus tuberosus* cultured in vitro. Amer. J. Bot. 56:702-717.

11. Halperin, W. and D. F. Wetherell. 1964. Adventive embryo in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer. J. Bot. 51(3):274-283.

12. Hawer, J. S., W. J. S. Downton, D. Wiskich and M. G. Mullins. 1973. Callus and cell culture from grape berries. Hort. Sci. 8(5):398-399.

13. Hildebrandt, A. C., A. J. Biker and B. M. Duggar. 1945. Growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue with different temperatures hydrogen-ion concentrations and amounts of sugar. Amer. J. Bot. 32:357-361.

14. Hildebrandt, A. C., A. J. Biker and B. M. Duggar. 1946b. The influence of the composition of the medium on growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue cultures. Amer. J. Bot. 33:591-597.

15. Hoover, W. H. 1937. The dependence of carbon dioxide assimilation in a higher plant on wave length of radiation. Smithsonian Inst. Misc. Collections 95:1-13.

16. Koski, V. M., C. S. Frensh and J. H. C. Smith. 1951. The action spectrum for the transformation of protochlorophyll chlorophyll a. Arch. Biochem. Biophys. 31:1-17.

17. Kowallik, W. and H. Gaffron. 1967. Enhancement of respiration and fermentation in algae by blue light. Nature 215:138-144.

18. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant physiol. 25:135-166.

19. Murashige, T. 1977. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Bot. Bull. Academia Sinica 18:1-24.

20. Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1956. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. Amer. J. Bot. 43:839-851.

21. Schroeder, C. A. 1968. Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue in vitro. Bot. Gaz. 129(4): 374-376.

22. Schroeder, C. A., E . Kay and L. H. Davis. 1962. Totipotency of cells from fruit pericarp tissue in vitro. Science 138:595-596.

23. Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears. 1958. Growth and organized freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45(10):705-708.

24. Weis, J. S. and M. J. Jaffe. 1969. Photoenhancement by blue light of organogenesis in tobacco pith cultures. Physiol. Plant. 22:171-176.

Studies on tissue culture of grape (*Vitis viniferal* L.)

Influence of environmental factors on the growth and differentiation of grape callus. [1]

Pen-Chih Lai and Shi-Tao Yie[2]

Summary

Callus from grape stem, leaf and fruit sections were induced in modified Gamborg and Eveleigh (1968) medium containing 0.1 mg/l of NAA, 0.2 mg/l of kinetin and 15% (w/v) of coconut milk. They were then subcultultured for testing the influence of medium pH and light factors on the callus growth.

Optimum pH of medium for the growth of stem callus was found to be 5.6 followed by 5.2. Values above 6.4 or below 4.8 were not suitable for weight increases of callus in culture.

Fruit callus showed maximum growth when grown under blue light. Vigorous growth was also found under red and yellow light. However, growth was limited when callus were subjected to green light or darkness treatment. A light intensity of 3,000 lux was observed to give the hightest growth rate of fruit callus followed by 1,500 and 750 lux. Higher (4,500 lux) or lower (250 lux) light irradiation was less effective in increasing both the fresh and dry weight of callus.

Histological studies showed that when grown on solid medium, callus cells originated from stem sections could differentiate into nest-like vacsular bundles which contained many lignified cells and tracheid elements in the interior. Some nodulous structures could further differentiate into roots. Shoot primordia from the peripheral layer of leaf callus were also recorded. Fruit callus showed no ability of differentiation.

In liquid culture, the leaf and stem callus were able to form poly-arch vascular bund -les but showed no sign of organ differentiation. Fruit callus cultured in liquid resulted in many free cells or cell clonies without any specific differentiation. It was concluded that the regeneration ability was much higher when grown on solid than in liquid medium.

1. Contribution No. 931 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Research Assistant, Department of Agronomy, TARI. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.

2. Professor, Department of Botany, National Chung-Hsing University, Taichung city, Taiwan 400, ROC.